カードマニュアルは下記アドレスからダウンロードできます。
http://www.dojindo.co.jp/manual/gk04.html

Technical　Manual

Get *pure*RNA Kit
50 samples

はじめに	P 2
キット内容	P 2
キット以外に必要な試薬・機器類	P 2
注意事項	P 2
保存方法	P 2
操作手順	
細胞 (1x10^6 〜3x10^6 cells)	P 2
細胞 (3x10^6 〜1x10^7 cells)	P 3
細胞 (1x10^7 〜1x10^8 cells)	P 3
組織 (25〜30 mg)	P 4
組織 (1 g)	P 5
血液 (200 µl)	P 6
血液 (5 ml)	P 6
サンプルサイズと試薬量	P 7
トラブルシューティング	P 8
参考データ	P 8
関連商品	P 8

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

はじめに

Get *pure*RNA Kit は、溶解液、タンパク除去液および DNase 溶液により構成されており、細胞・動物組織・血液から高純度の Total RNA を短時間で抽出することができます。CsCl 超遠心法のような超遠心を必要とせず、またフェノール、クロロホルム等の有害な有機溶媒を使用しません。シリカベースのスピンカラム法の様にサンプル量の制限がなく、大量サンプルからの抽出も可能です。得られた RNA は RT-PCR、ノーザンブロット解析、cDNA 合成等にご使用いただけます。

キット内容

50 sample kit

• Lysis buffer	13 ml x 2
• Precipitation solution I	13 ml x 1
• Precipitation solution II	8 ml x 1
• DNase	0.55 ml x 1
• DNase dilution buffer	12 ml x 1

キット以外に必要な試薬・機器類

- β - Mercaptoethanol
- 100% ethanol 及び 70% ethanol
- DEPC-treated water
- PBS(細胞からの抽出)
- RNase free マイクロチューブまたは遠心チューブ
- マイクロピペット及びチップ
- 遠心分離機
- ボルテックスミキサー
- ホモジナイザー(組織からの抽出)
- 37℃恒温槽またはインキュベーター

注意事項

- 高純度の Total RNA を高回収率で抽出するために、新鮮な組織、細胞あるいは血液サンプルをご使用下さい。
- 使用の際は RNase の混入を防ぐため手袋を着用してください。また RNase free のバッファーをご使用下さい。
- ホモジナイザーで組織片をホモジナイズする際は、あらかじめ Lysis buffer を加えた抽出液を氷冷しながら短時間で処理してください。
- Precipitation solution I は、多少濁っている場合もありますが、RNA の抽出には影響ありません。
- Precipitation solution I および Precipitation solution II は、一旦開封するとボトルの口に白い結晶が析出する場合がありますが、RNA の抽出操作には影響ありません。そのままご使用下さい。
- 遠心操作は遠心機および遠心チューブの最高遠心速度で行ってください。遠心チューブの種類により、10000 xg 以上の遠心が不可能な場合は、遠心時間を延長しその遠心チューブの許容最高速度で遠心分離してください。

保存方法

冷蔵保存(0-5℃)
-開封後、DNase は冷凍保存して下さい。

操作手順（細胞サンプル）

サンプル量により抽出回数は異なりますので御注意下さい。

細胞　1 x 10^6 ~ 3 x 10^6 cells

本キットで、50 回抽出できます。

1) 1.5 ml マイクロチューブに細胞懸濁液を入れ、遠心分離し培地を除去する。細胞ペレットを RNase free PBS 500μl で懸濁洗浄し、200xg、5 分間遠心分離する。

2) 上澄みを除去し、Lysis buffer 250 μl、β-Mercaptoethanol(別途準備) 2.5μl を加え、ピペッティングにより細胞を完全に溶解する。低粘度になるまでおよそ 2~3 分要する。

3) Precipitation solution I　50μl を加え 5 秒間 vortex する。
∗Precipitation solution I を添加すると溶液は白濁します。

4) 13000 xg 以上で、5 分間遠心分離し、上澄みを別の遠心チューブに集める。
∗不溶物をピペットで吸引しないようご注意ください。上澄みに不溶物が混入している場合は、再度遠心操作を行って下さい。

5) 上澄みと同量のエタノールを加え、転倒混和もしくは 5 秒間 vortex する。

6) 13000 xg 以上で 2 分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。
∗上澄みをピペットで除去する際に、RNA ペレットを吸い込まないようご注意ください。完全に上澄みを除去するために、除去の最終段階では、最小容量用マイクロピペット(<20 μl)のご使用をお勧めします。

7) 70%エタノール 1 ml を加え、5 秒間 vortex する。

8) 13000 xg 以上で 2 分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。

9) 別のチューブに、20 倍希釈 DNase working 溶液を調製する。
例： DNase 10 μl + DNase dilution buffer 190 μl

10) DNase working 溶液 200μl を 8)のチューブに加え、ペレットを溶解する。
∗ペレットは完全に溶解しないことがあります。その場合は十分に懸濁混合してください。

11) 37℃、15 分間インキュベーションする。

12) Precipitation solution I　50μl を加え 5 秒間 vortex する。
∗Precipitation solution I を添加すると溶液は白濁します。

13) Precipitation solution II　50μl を加え 5 秒間 vortex する。
∗Precipitation solution II を添加すると溶液は更に白濁します。

14) 13000 xg 以上で 5 分間遠心分離し、上澄みを別のチュ

ーブに集める。
＊不溶物をピペットで吸引しないようご注意ください。上澄みに不溶物が混入している場合は、再度遠心操作を行って下さい。

15) **上澄みと同量のエタノールを加え、転倒混和もしくは** 5 **秒間** vortex **する。**

16) 13000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**
＊上澄みをピペットで除去する際に、RNA ペレットを吸い込まないようご注意ください。完全に上澄みを除去するために、除去の最終段階では、最小容量用マイクロピペット(<20 μl)のご使用をお勧めします。

17) 70%**エタノール** 1 ml **を加え、**5 **秒間** vortex **する。**

18) 13000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**

19) RNase free **水**(DEPC-treated water)**もしくは** RNase free buffer **を加えペレットを溶解する。**

細胞　3 x 10^6 ~ 1 x 10^7 cells

本キットで、50 **回抽出できます。**

1) 1.5 ml **マイクロチューブに細胞懸濁液を入れ、遠心分離し培地を除去する。 細胞ペレットを** PBS 500 μ l **で懸濁洗浄し、**200xg、5 **分間遠心分離する。**

2) **上澄みを除去し、** Lysis buffer 500 μ l **、 β** -Mercaptoethanol(**別途準備**) 5 μ l **を加え、ピペッティングにより細胞を完全に溶解する。低粘度になるまでおよそ** 2~3 **分要する。**

3) Precipitation solution I 100 μl **を加え** 5 **秒間** vortex **する。**
＊Precipitation solution I を添加すると溶液は白濁します。

4) 13000 xg **以上で、**5 **分間遠心分離し、上澄みを別の遠心チューブに集める。**
＊不溶物をピペットで吸引しないようご注意ください。上澄みに不溶物が混入している場合は、再度遠心操作を行って下さい。

5) **上澄みと同量のエタノールを加え、転倒混和もしくは** 5 **秒間** vortex **する。**

6) 13000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**
＊上澄みをピペットで除去する際に、RNA ペレットを吸い込まないようご注意ください。完全に上澄みを除去するために、除去の最終段階では、最小容量用マイクロピペット(<20 μl)のご使用をお勧めします。

7) 70%**エタノール** 1 ml **を加え、**5 **秒間** vortex **する。**

8) 13000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**

9) **別のチューブに、**20 **倍希釈** DNase working **溶液を調製する。**
例： DNase 10 μl + DNase dilution buffer 190 μl

10) DNase working **溶液** 200 μ l **を** 8)**のチューブに加え、ペレットを溶解する。**
＊ペレットは完全に溶解しないことがあります。その場合は十分に懸濁混合してください。

11) 37℃、15 **分間インキュベーションする。**

12) Precipitation solution I　50 μl **を加え** 5 **秒間** vortex **する。**
＊Precipitation solution I を添加すると溶液は白濁します。

13) Precipitation solution II　50 μl **を加え** 5 **秒間** vortex **する。**
＊Precipitation solution II を添加すると溶液は更に白濁します。

14) 13000 xg **以上で** 5 **分間遠心分離し、上澄みを別のチューブに集める。**
＊不溶物をピペットで吸引しないようご注意ください。上澄みに不溶物が混入している場合は、再度遠心操作を行って下さい。

15) **上澄みと同量のエタノールを加え、転倒混和もしくは** 5 **秒間** vortex **する。**

16) 13000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**
＊上澄みをピペットで除去する際に、RNA ペレットを吸い込まないようご注意ください。完全に上澄みを除去するために、除去の最終段階では、最小容量用マイクロピペット(<20 μl)のご使用をお勧めします。

17) 70%**エタノール** 1 ml **を加え、**5 **秒間** vortex **する。**

18) 13000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**

19) RNase free **水**(DEPC-treated water)**もしくは** RNase free buffer **を加えペレットを溶解する。**

細胞 1 x 10^7 ~ 1 x 10^8 cells

本キットで、5 **回抽出できます。**

1) 50 ml **遠心チューブに細胞懸濁液を入れ、遠心分離し培地を除去する。細胞ペレットを** PBS 5 ml **で懸濁洗浄し、**200xg、5 **分間遠心分離する。**

2) **上澄みを除去し、** Lysis buffer 5 ml **、 β** -Mercaptoethanol(**別途準備**) 50 μ l **を加え、ピペッティングにより細胞を完全に溶解する。低粘度になるまでおよそ** 2~3 **分要する。**

3) Precipitation solution I　1 ml **を加え、**5 **秒間** vortex **する。**
＊Precipitation solution I を添加すると溶液は白濁します。

4) 10000 xg **以上で、**5 **分間遠心分離し、上澄みを別の遠心チューブに集める。**
＊不溶物をピペットで吸引しないようご注意ください。上澄みに不溶物が混入している場合は、再度遠心操作を行って下さい。

5) **上澄みと同量のエタノールを加え、転倒混和もしくは** 5 **秒間** vortex **する。**

6) 10000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**
＊上澄みをピペットで除去する際に、RNA ***ペレットを吸い込まないようご注意ください。完全に上澄みを除去するために、除去の最終段階では、最小容量用マイクロピペット***(<20 μl)***のご使用をお勧めします。***

7) 70%**エタノール** 10 ml **を加え、**5 **秒間** vortex **する。**

8) 10000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**

9) **別のチューブに、**20 **倍希釈** DNase **溶液を調製する。**
例： DNase 100 μl + DNase dilution buffer 1.9 ml

10) DNase working **溶液** 2 ml **を** 8)**のチューブに加え、ペレットを溶解する。**
＊ペレットは完全に溶解しないことがあります。その場合は十分に懸濁混和してください。

11) 37**℃、**15 **分間インキュベーションする。**

12) Precipitation solution I　500 μl **を加え** 5 **秒間** vortex **する。**
＊Precipitation solution I を添加すると溶液は白濁します。

13) Precipitation solution II　500 μl **を加え** 5 **秒間** vortex **する。**
＊Precipitation solution II を添加すると溶液は更に白濁します。

14) 10000 xg **以上で** 5 **分間遠心分離し、上澄みを別のチューブに集める。**
＊不溶物をピペットで吸引しないようご注意ください。上澄みに不溶物が混入している場合は、再度遠心操作を行って下さい。

15) **上澄みと同量のエタノールを加え、転倒混和もしくは** 5 **秒間** vortex **する。**

16) 10000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**
＊上澄みをピペットで除去する際に、RNA ***ペレットを吸い込まないようご注意ください。完全に上澄みを除去するために、除去の最終段階では、最小容量用マイクロピペット***(<20 μl)***のご使用をお勧めします。***

17) 70%**エタノール** 10 ml **を加え、**5 **秒間** vortex **する。**

18) 10000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**

19) RNase free **水**(DEPC-treated water)**もしくは** RNase free buffer **を加えペレットを溶解する。**

操作手順 (組織サンプル)

サンプル量により抽出回数は異なりますので御注意下さい。

組織　25 ~ 30 mg

本キットで、50 **回抽出できます。**

1) **組織を** 1.5 ml **遠心チューブに入れ** Lysis buffer 500 μl、β-Mercaptoethanol(**別途準備**) 5 μl **を加える。**

2) **氷冷下、ホモジナイザーで** 30~60 **秒間ホモジナイズする。**
＊ホモジナイザーを使用する際は、組織サンプルをあらかじめ細かく刻み試料混合液を氷冷して下さい。

3) Precipitation solution I 100 μl **を加え** 5 **秒間** vortex **する。**
＊Precipitation solution I を添加すると溶液は沈殿を生じます。

4) 13000 xg **以上で、**5 **分間遠心分離し、上澄みを別の遠心チューブに集める。**
＊不溶物をピペットで吸引しないようご注意ください。上澄みに不溶物が混入している場合は、再度遠心操作を行って下さい。

5) **上澄みと同量のエタノールを加え、転倒混和もしくは** 5 **秒間** vortex **する。**

6) 13000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**
＊上澄みをピペットで除去する際に、RNA ***ペレットを吸い込まないようご注意ください。完全に上澄みを除去するために、除去の最終段階では、最小容量用マイクロピペット***(<20 μl)***のご使用をお勧めします。***

7) 70%**エタノール** 1 ml **を加え、**5 **秒間** vortex **する。**

8) 13000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**

9) **別のチューブに、**20 **倍希釈** DNase **溶液を調製する。**
例： DNase 10 μl + DNase dilution buffer 190 μl

10) DNase working **溶液** 200 μl **を** 8)**のチューブに加え、ペレットを溶解する。**
＊ペレットは完全に溶解しないことがあります。その場合は十分に懸濁混合してください。

11) 37**℃、**15 **分間インキュベーションする。**

12) Precipitation solution I　50 μl **を加え** 5 **秒間** vortex **する。**
＊Precipitation solution I を添加すると溶液は白濁します。

13) Precipitation solution II　50 μl **を加え** 5 **秒間** vortex **する。**
＊Precipitation solution II を添加すると溶液は更に白濁します。

14) 13000 xg **以上で** 5 **分間遠心分離し、上澄みを別のチューブに集める。**
＊不溶物をピペットで吸引しないようご注意ください。上澄みに不溶物が混入している場合は、再度遠心操作を行って下さい。

15) **上澄みと同量のエタノールを加え、転倒混和もしくは** 5 **秒間** vortex **する。**

16) 13000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**
＊上澄みをピペットで除去する際に、*RNA** ***ペレットを吸い込まないようご注意ください。完全に上澄みを除去するために、除去の最終段階では、最小容量用マイクロピペット***(<20 μl)***のご使用をお勧めします。***

17) 70%**エタノール** 1 ml **を加え、**5 **秒間** vortex **する。**

18) 13000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**

19) RNase free **水**(DEPC-treated water)**もしくは** RNase free buffer **を加えペレットを溶解する。**

組織　1 g

本キットで、1 **回抽出できます。**

1) **組織を** 50 ml **遠心チューブに入れ、**Lysis Buffer　20 ml、β-Mercaptoethanol(**別途準備**)100　μ　l **を加える。**
2) **氷冷下、ホモジナイザーで** 30~60 **秒間ホモジナイズする。**
＊ホモジナイザーを使用する際は、組織サンプルをあらかじめ細かく刻み試料混合液を氷冷して下さい。

3) Precipitation solution I　4 ml **を加え、**5 **秒間** vortex **する。**
＊Precipitation solution I ***を添加すると溶液は沈殿を生じます。***

4) 10000 xg **以上で、**5 **分間遠心分離し、上澄みを別の遠心チューブに集める。**
＊不溶物をピペットで吸引しないようご注意ください。上澄みに不溶物が混入している場合は、再度遠心操作を行って下さい。

5) **上澄みと同量のエタノールを加え、転倒混和もしくは** 5 **秒間** vortex **する。**

6) 10000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**
＊上澄みをピペットで除去する際に、*RNA** ***ペレットを吸い込まないようご注意ください。完全に上澄みを除去するために、除去の最終段階では、最小容量用マイクロピペット***(<20 μl)***のご使用をお勧めします。***

7) 70%**エタノール** 20 ml **を加え、**5 **秒間** vortex **する。**

8) 10000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**

9) **別のチューブに、**20 **倍希釈** DNase working **溶液を調製する。**
例： *DNase 0.4 ml + DNase dilution buffer 7.6 ml*

10) DNase working **溶液** 8 ml **を** 8)**のチューブに加え、ペレットを溶解する。**
＊ペレットは完全に溶解しないことがあります。その場合は十分に懸濁混和してください。

11) 37℃、15 **分間インキュベーションする。**

12) Precipitation solution I　2 ml **を加え、**5 **秒間** vortex **する。**
＊Precipitation solution I ***を添加すると溶液は白濁します。***

13) Precipitation solution II　2 ml **を加え、**5 **秒間** vortex **する。**
＊Precipitation solution II ***を添加すると溶液は更に白濁します。***

14) 10000 xg **以上で** 5 **分間遠心分離し、上澄みを別のチューブに集める。**
＊不溶物をピペットで吸引しないようご注意ください。上澄みに不溶物が混入している場合は、再度遠心操作を行って下さい。

15) **上澄みと同量のエタノールを加え、転倒混和もしくは** 5 **秒間** vortex **する。**

16) 10000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**
＊上澄みをピペットで除去する際に、*RNA** ***ペレットを吸い込まないようご注意ください。完全に上澄みを除去するために、除去の最終段階では、最小容量用マイクロピペット***(<20 μl)***のご使用をお勧めします。***

17) 70%**エタノール** 20 ml **を加え、**5 **秒間** vortex **する。**

18) 10000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**

19) RNase free **水**(DEPC-treated water)**もしくは** RNase free buffer **を加えペレットを溶解する。**

操作手順（血液サンプル）

サンプル量により抽出回数は異なりますので御注意下さい。

血液　200μ l

本キットで、50 **回抽出できます。**

1) **採取した全血** 200μl **を** 1.5 ml **マイクロチューブに入れ、**Lysis Buffer 300μl、β-Mercaptoethanol (**別途準備**) 5　μ l **を加える。ピペッティングにより血液細胞を完全に溶解する。低粘度になるまでおよそ** 2~3 **分要する。**

2) Precipitation solution I 100μl **を加え** 5 **秒間** vortex **する。**
＊Precipitation solution I ***を添加すると沈澱を生じます。***

3) Precipitation solution II 100μl を加え、5 秒間 vortex する。
＊Precipitation solution II を添加するとさらに沈澱を生じます。

4) 13000 xg 以上で 5 分間遠心分離し、上澄みを別の遠心チューブに集める。
＊不溶物をピペットで吸引しないようご注意ください。

5) Precipitation solution I 100 μl を加え 5 秒間 vortex する。
＊Precipitation solution I を添加すると溶液は白濁します。

6) 13000 xg 以上で 5 分間遠心分離し、上澄みを別の遠心チューブに集める。
＊不溶物をピペットで吸引しないようご注意ください。上澄みに不溶物が混入している場合は、再度遠心操作を行って下さい。

7) 上澄みと同量のエタノールを加え、転倒混和もしくは 5 秒間 vortex する。
＊エタノールを加える前に RNA 共沈剤として glycogen(20 mg/ml)を 2 μl 添加することで、RNA ペレットを失うことなく回収できます。

8) 13000 xg 以上で 2 分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。70%エタノールを 1 ml 加え 5 秒間 vortex する。
＊上澄みをピペットで除去する際に、RNA ペレットを吸い込まないようご注意ください。完全に上澄みを除去するために、除去の最終段階では、最小容量用マイクロピペット(<20 μl)のご使用をお勧めします。

9) 13000 xg 以上で 2 分間遠心分離し、上澄みをピペットで除去する。

10) 別のチューブに、20 倍希釈 DNase working 溶液を調製する。
例： DNase 10 μl + DNase dilution buffer 190 μl

11) DNase working 溶液 200μl を 9)のチューブに加え、ペレットを溶解する。
＊ペレットは完全に溶解しないことがあります。その場合は十分に懸濁混合してください。

12) 37℃、15 分間インキュベーションする。

13) Precipitation solution I 50μl を加え 5 秒間 vortex する。
＊Precipitation solution I を添加すると溶液は白濁します。

14) Precipitation solution II 50μl を加え 5 秒間 vortex する。
＊Precipitation solution II を添加すると溶液は更に白濁します。

15) 13000 xg 以上で 5 分間遠心分離し、上澄みを別のチューブに集める。
＊不溶物をピペットで吸引しないようご注意ください。上澄みに不溶物が混入している場合は、再度遠心操作を行って下さい。

16) 上澄みと同量のエタノールを加え、転倒混和もしくは 5 秒間 vortex する。
＊エタノールを加える前に RNA 共沈剤として glycogen(20 mg/ml)を 2 μl 添加することで、DNA ペレットを失うことなく回収できます。

17) 13000 xg 以上で 2 分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。
＊上澄みをピペットで除去する際に、RNA ペレットを吸い込まないようご注意ください。完全に上澄みを除去するために、除去の最終段階では、最小容量用マイクロピペット(<20 μl)のご使用をお勧めします。

18) 70%エタノール 1 ml を加え、5 秒間 vortex する。

19) 13000 xg 以上で 2 分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。

20) RNase free 水(DEPC-treated water)もしくは RNase free buffer を加えペレットを溶解する。

血液　5 ml

本キットで、2 回抽出できます。

1) 採取した 5 ml 全血を 50 ml 遠心チューブに入れ、Lysis Buffer 7.5 ml、β-Mercaptoethanol (別途準備)125 μl を加える。ピペッティングにより血液細胞を完全に溶解する。低粘度になるまでおよそ 2~3 分要する。

2) Precipitation solution I 2.5 ml を加え 5 秒間 vortex する。
＊Precipitation solution I を添加すると沈澱を生じます。

3) Precipitation solution II 2.5 ml を加え 5 秒間 vortex する。
＊Precipitation solution II を添加するとさらに沈澱を生じます。

4) 10000 xg 以上で 5 分間遠心分離し、上澄みを別の遠心チューブに集める。
＊不溶物をピペットで吸引しないようご注意ください。

5) Precipitation solution I 2.5 ml を加え 5 秒間 vortex する。
＊Precipitation solution I を添加すると溶液は白濁します。

6) 10000 xg 以上で 5 分間遠心分離し、上澄みを別の遠心チューブに集める。
＊不溶物をピペットで吸引しないようご注意ください。上澄みに不溶物が混入している場合は、再度遠心操作を行って下さい。

7) 上澄みと同量のエタノールを加え、転倒混和もしくは 5 秒間 vortex する。

8) 10000 xg 以上で 2 分間遠心分離し、上澄みをピペットで除去する。70%エタノールを 10 ml 加え 5 秒間 vortex する。
＊上澄みをピペットで除去する際に、RNA ペレットを吸い込まないようご注意ください。完全に上澄みを除去するために、除去の最終段階では、最小容量用マイクロピペット(<20 μl)のご

使用をお勧めします。

9) 10000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除去する。**

10) **別のチューブに、**20 **倍希釈** DNase working **溶液を調製する。**
例： DNase 200 μl + DNase dilution buffer 3.8 ml

11) DNase working **溶液** 4 ml **を** 9)**のチューブに加え、ペレットを溶解する。**
ペレットは完全に溶解しないことがあります。その場合は十分に懸濁混合してください。

12) 37**℃、**15 **分間インキュベーションする。**

13) Precipitation solution I 1 ml **を加え** 5 **秒間** vortex **する。**
＊Precipitation solution I を添加すると溶液は白濁します。

14) Precipitation solution II 1 ml **を加え** 5 **秒間** vortex **する。**
＊Precipitation solution II を添加すると溶液は更に白濁します。

15) 10000 xg **以上で** 5 **分間遠心分離し、上澄みを別のチューブに集める。**
不溶物をピペットで吸引しないようご注意ください。上澄みに不溶物が混入している場合は、再度遠心操作を行って下さい。

16) **上澄みと同量のエタノールを加え、転倒混和もしくは** 5 **秒間** vortex **する。**

17) 10000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**
＊上澄みをピペットで除去する際に、RNA ペレットを吸い込まないようご注意ください。完全に上澄みを除去するために、除去の最終段階では、最小容量用マイクロピペット(<20 μl)のご使用をお勧めします。

18) 70%**エタノール** 10 ml **を加え、**5 **秒間** vortex **する。**

19) 10000 xg **以上で** 2 **分間遠心分離し、上澄みをピペットで除く。**

20) RNase free **水**(DEPC-treated water)**もしくは** RNase free buffer **を加えペレットを溶解する。**

サンプルサイズと試薬量

Sample materials	Cell			Tissue		Blood	
Sample scale	1 ~ 3 x 10^6	3 ~ 10 x 10^6	1 ~ 10 x 10^7	25 ~ 30 mg	1 g	200 μl	5 ml
Lysis buffer	250 ul	500 ul	5 ml	500 ul	20 ml	300 ul	7.5 ml
β-Mercapto ethanol	2.5 ul	5 ul	50 ul	5 ul	200 ul	5 ul	125 ul
Precipitation Soln. I or II (Step2 or 3)	50 ul	100 ul	1 ml	100 ul	4 ml	100 ul	2.5 ml
DNase working solution	200 ul	200 ul	2 ml	200 ul	8 ml	200 ul	4 ml
Precipitation Soln. I, II (Step12,13 or14)	50 ul	50 ul	500 ul	50 ul	2 ml	50 ul	1 ml

***血液からの抽出操作は細胞・組織の場合と異なりますので、操作手順にてご確認下さい。**

トラブルシューティング

1) RNA が回収できない、または回収率が低い。
-ピペッティングもしくはvortex mixにて試料を完全に溶解してください。
-上澄み除去の前に、RNA ペレットがチューブの壁面に付着していることを確認して下さい。

2) 組織サンプルが Lysis buffer に溶けにくい。
-組織サンプルをチューブに入れる際、あらかじめ細かく刻むかもしくは窒素凍結/粉砕して下さい。
-ホモジナイザーのご使用は、装置の取り扱い説明書にしたがってください。尚、ホモジナイザーを使用し組織片をホモジェナイズする際は、あらかじめ Lysis buffer を加えた抽出液を氷上で冷却し短時間で処理してください。

3) Precipitation solution II 添加後の沈殿物が固くパックされていない。
-試料を完全に溶解して Precipitation solution I を加えてください。
-Precipitation solution I 及び II を加えた後、均一になるよう転倒混和もしくは vortex を行ってください。
-10000 xg 以上の遠心が困難な場合は、遠心時間を延長し沈殿物が完全にパックされるまで遠心して下さい。

4) 回収 RNA の純度が低い。
-不溶物をピペットで吸い込まないようご注意ください。
-エタノール沈殿後など完全に上澄みを除去するために、除去の最終段階では、最小容量用マイクロピペット(<20 μl)のご使用をお勧めします。

5) 回収 RNA が分解/切断されている。
-新鮮な試料を用いてください。
-エタノール、マイクロチューブ、及びピペットチップ等の試薬・器具は、RNase-free のものをお使いください。

参考データ

表. Total RNA 回収量とその純度

Sample	回収量 (μg)	A_{260}/A_{280}
HeLa (1 x 10^7 cells)	90 – 150	2.0-2.2
Balb3T3 (1 x 10^7 cells)	90 – 150	2.0-2.2
HL60 (1 x 10^7 cells)	30 – 60	2.0-2.2
Mouse liver (20 mg)	60 – 75	2.0-2.2
Mouse brain (30 mg)	15 – 25	2.0-2.2
Mouse kidney (30 mg)	40 – 55	2.0-2.2
Mouse heart (30 mg)	7 – 15	2.0-2.2
Mouse liver (1.0 g)	3800-4400	2.0-2.2
Mouse brain (1.0 g)	700-1000	2.0-2.2
Mouse blood (5 ml)	70-120	2.0-2.2

*上記 A_{260}/A_{280} 値は、回収 RNA を TE buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH8.0)に溶解した際の値です。DEPC-treated water に溶解すると、A_{260}/A_{280} 値が低く算出される場合があります。

<開発元>
Dojindo Molecular Technologies, Inc.
211 Perry Parkway, Suite 5, Gaithersburg, MD 20877
Telephone : +1-301-987-2667
Fax : +1-301-987-2687
URL : http://www.dojindo.com/

<委託製造元>
株式会社同仁化学研究所
Tel: 096-286-1515(代表)　Fax: 096-286-1525
ドージン・イースト (東京)
Tel: 03-3578-9651(代表)　Fax: 03-3578-9650